人源类溶菌酶蛋白 6 的功能研究及生理特性分析

黄鹏[1]，杜望春[1]，施尉珺[1]，饶玉良[2]，孙庆文[3]，张宁[2**]

(1 上海健康医学院临床医学院 上海 201318)

（2 上海健康医学院基础医学院 上海 201318)

（3 复旦大学生命科学学院 上海 200438)

摘要 对人源类溶菌酶蛋白 6（human lysozyme-like protein 6，LYZL6）在受精过程中的作用进行研究，并对重组 LYZL6 蛋白（recombinant LYZL6，rLYZL6）的生理特性进行分析，从而揭示其生理功能。细胞免疫荧光法确定 LYZL6 定位于成熟精子头部的顶体后区域，反转录 PCR（RT-PCR）分析表明精子表面的 LYZL6 蛋白来源于睾丸和附睾的分泌，Western blot 法分析表明精子获能前后表面 LYZL6 的量无明显改变。半透明带结合实验和精子穿透实验分析表明兔抗 LYZL6 血清未明显抑制人精子结合透明带，但可明显抑制精卵融合。利用毕赤酵母表达系统成功表达了 rLYZL6，使用甲壳素亲和层析和凝胶过滤层析可从发酵上清中纯化到具有生物活性的 rLYZL6。酶联免疫吸附法（ELISA）分析显示 rLYZL6 不具有透明质酸结合能力、透明质酸水解能力和自由基清除活性，但具有较强的肽聚糖结合能力和异肽酶活性。LYZL6 由睾丸和附睾分泌后定位于成熟精子头部的顶体后区域，可以参与精卵融合，并具有肽聚糖结合能力和异肽酶活性，提示 LYZL6 可能通过多种机制参与精子功能。

关键词 人源类溶菌酶蛋白 6 顶体 受精 毕赤酵母 异肽酶活性

中图分类号：Q492.41

* 上海市卫生计生委科研课题（201740161）、上海市自然科学基金（15ZR1421800）资助项目

**通讯作者，电子邮箱：zhangn@sumhs.edu.cn

The Functional Studies of Human Lysozyme-like Protein 6 and Characterization of Its Physiological Properties

HUANG Peng[1], DU Wang-chun[1], SHI Wei-jun[1], RAO Yu-liang[2], SUN Qing-wen[3], ZHANG Ning[2]

(1 School of Clinical Medicine, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China)

(2 School of Basic Medicine, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China)

(3 School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract The aim is to identify the possible performance of human lysozyme-like protein 6 (LYZL6) in fertilization and to characterize its physiological properties. Immunofluorescent staining with a specific antiserum localized the LYZL6 protein on the postacrosomal membrane of mature spermatozoa, which was secreted by testis and epididymis as demonstrated by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). No significant decrease of LYZL6 after capacitation was observed by Western blot analysis. Immunoneutralization of LYZL6 showed no effect on the binding of spermatozoa to the hemizona, but significantly decreased the numbers of human spermatozoa fused to zona-free hamster eggs in a dose-dependent manner. The *Pichia* expression system was utilized to produce recombinant LYZL6 (rLYZL6). After induction with methanol, rLYZL6 was purified from the fermentation supernatant by chitin affinity in combination with gel-filtration chromatography. *In vitro* assays indicated that rLYZL62 possessed no hyaluronan-binding ability, hyaluronidase activity and free radical scavenging activity, but peptidoglycan-binding ability and isopeptidase activity. In conclusion, we report here that LYZL6, a human sperm-related protein, not only plays a role in sperm-egg fusion but also has peptidoglycan-binding ability and isopeptidase activity, suggesting it might contribute to diverse sperm functions.

Key words Human lysozyme-like protein 4 Acrosome Fertilization *Pichia pastoris* Isopeptidase activity

在哺乳动物的睾丸中，未分化的生殖细胞要发育成为成熟的精子细胞要经过一个复杂的过程，睾丸及附睾组织分泌的许多蛋白也定位与精子细胞上，这些分子可以直接参与精子与卵子的相互作用，在受精过程中发挥重要作用，类溶菌酶蛋白就是其中之一。类溶菌酶蛋白是最近在哺乳动物生殖系统中发现的一种球蛋白，属于 c 型溶菌酶/α乳清蛋白家族。目前已经从人体内克隆到五种类溶菌酶蛋白的编码基因（*LYZL2*，*LYZL4*，*LYZL5*，*LYZL6*，*SPACA3*）[1]，初步的研究表明类溶菌酶蛋白在组织分布、存在形式、杀菌活性和生理功能方面均与溶菌酶有所不同[2-4]。在哺乳动物中，溶菌酶广泛分布于各种组织和体液，其主要通过破坏细菌细胞壁引起细菌裂解死亡而参与生物体先天性免疫防御[5-6]。与之不同，目前已报道的类溶菌酶蛋白则存在于雄性哺乳动物（如小鼠、大鼠和人）的生殖系统，定位于睾丸、附睾和精子上，主要与精子功能相关，在受精过程中发挥一定作用[7-11]。如：人 *SPACA3* 基因编码人精子类溶菌酶蛋白 1（human sperm lysozyme-like protein 1，SLLP1）并不具有杀菌活性，其被表达后分布于精子头部顶体区域，能够在受精过程中发挥作用[7]。人类溶菌酶蛋白 4（human lysozyme-like protein 6，LYZL4）在体外也没有显示杀菌活性，由睾丸和附睾组织表达后，定位于圆形精子细胞及长形精子细胞的顶体上，提示其可能与顶体结构或功能相关[11]。

本课题组初步研究表明人类溶菌酶蛋白 6（human lysozyme-like protein 6，LYZL6）具有杀菌活性，其被睾丸和附睾表达后分布于精子头部顶体后区域，并可能在受精过程中发挥作用[8-10]。与 SLLP1 和 LYZL4 相比，LYZL6 可能具有更多的功能。本研究拟对 LYZL6 在受精过程中的作用做进一步研究，并对其生理特性进行深入分析，从而揭示 LYZL6 的生理功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及试剂　表达 rLYZL6 的重组毕赤酵母、兔抗 LYZL4 免疫血清、甲壳素亲和层析介质由本研究室制备并保存；核酸和蛋白分子量标准、Pyrobest DNA 聚合酶、辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔 IgG 购自 TaKaRa 公司；所有引物由 Sangon Biotech 公司合成；BMGY 培养基按 Invitrogen 公司的毕赤酵母实验操作手册配制；罗丹明标记的羊抗兔 IgG、络合异硫氰酸荧光素的豌豆凝

集素（FITC-PSA）、胰蛋白酶、透明质酸酶（haluronidase，HAase）、LYZ 标准品、透明质酸、肽聚糖、1,1-二苯基苦基苯肼（DPPH）和 L-γ-谷氨酰-对硝基苯胺（L-γ-Glu-pNA）均购自 Sigma-Aldrich 公司；ECL 检测试剂盒购自 Beyotime 公司；溶壁微球菌由本研究室保存；Isolate 试剂盒购自 Irvine Scientific 公司；3, 5-二硝基水杨酸（3, 5-dinitrosalicylic acid，DNS）、邻苯二胺等化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2　实验动物　金线仓鼠购自上海松联实验动物中心。

1.1.3　样本来源　健康成年男性精液样本和体外授精剩余的人成熟卵细胞由上海曙光医院东院生殖医学中心提供，样本的获取及使用均得到捐献者书面知情同意。

1.2　方法

1.2.1　精子免疫荧光分析　将新鲜收集的精液用 Isolate 试剂盒分离精子细胞，400× *g* 离心 15 min，收集细胞沉淀，用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗涤两次后重悬；取 15 μL 细胞悬液涂布多聚赖氨酸处理过的载玻片，室温干燥 15 min；3%牛血清白蛋白溶液封闭 10 min，滴加 50 μL 兔抗 LYZL6 血清（1:100 稀释）孵育过夜，用免疫前兔血清作为阴性对照；PBS 洗涤三次后，加滴加 50 μL 罗丹明标记的羊抗兔 IgG（1:200 稀释），暗室静置 1 h；PBS 洗涤三次后，滴加 6%的 FITC-PSA，暗室静置 1 h 后加盖玻片后荧光显微镜拍照。

1.2.2　RT-PCR　精子、附睾和睾丸的 cDNA 由本研究室制备。正向引物 RT-*LYZL6*-F 和反向引物 RT-*LYZL6*-R 根据 *LYZL6* 基因序列设计（GenBank accession no. NM_020426.3），扩增产物为 319 bp。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase，G3PDH）作为内对照，扩增产物为 247 bp。扩增条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，65 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 30 s，反应进行 35 个循环，72 ℃延伸 5 min。

1.2.3　精子蛋白提取物制备　将两份 1.5 mL 精液样本 6000× *g* 离心 15 min，用 PBS 洗涤精子细胞沉淀两次，600× *g* 离心 8 min，收集细胞沉淀。向其中一份细胞沉淀中加入 250 μL 含有 1×蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液重悬，超声处理 45 s，室温裂解 20 min，12000× *g* 离心 10 min，吸取顶部上清液作为精子蛋白提取物样品，-80 ℃冻存。将另一份细胞沉淀重悬于 Biggers, Whitten, and Whittingham

（BWW）培养基（含 30 mg/mL 人体血清白蛋白）中过夜获能，之后离心收集沉淀，按上述方法制备获能后精子蛋白提取物样品。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后，在 Bio-Rad 电转移系统中转移至硝酸纤维素膜，进行 Western blot 分析。

表 1　研究所用引物序列

Table 1　Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5′-3′)
RT-*LYZL6*-F	ATGACAAAGGCGCTACTCATC
RT-*LYZL6*-R	GAAGGTTGGGATTCAGCAGATC
GAPDH-F	CGTGGAAGGACTCATGACC
GAPDH-R	GAGGCAGGGATGATGTTCTG

1.2.4　精子穿透试验　将精液样本与 BWW 培养基（含 5 mg/mL 人体血清白蛋白）混合后置 37 ℃培养箱（含 5% CO_2）孵育 2 h，收集游出的精子细胞后，600× *g* 离心 8 min，收集细胞沉淀，8 mL 的相同培养基洗涤两次。然后将精子细胞重悬于 BWW 培养基（含 30 mg/mL 人血清白蛋白）中过夜获能（浓度为 2×10^5 个/mL）。首先向金线仓鼠注射 30 IU 的 eCG，72 h 后注射 hCG 以超排卵子，16 h 后处死动物并分离丘-卵复合体。用透明质酸酶（1 mg/mL）处理复合体 3 min 以去除卵丘细胞，将获得的卵子置于矿物油中用培养基冲洗，用胰蛋白酶（1 mg/mL）处理 30 s 后洗涤 3 次，然后将卵子随机分组。将获能的精子与不同浓度的兔抗 LYZL4 血清混合后置 37 ℃培养箱（含 5% CO_2）孵育 1 h，用兔免疫前血清作为对照，然后加入去除透明带的仓鼠卵子细胞继续孵育 3 h。孵育结束后洗涤卵子细胞以去除未结合的精子，然后将卵子细胞置于载玻片上并加盖玻片，观察并计数融合的精子数，精子头部膨大作为与卵子融合的判断依据。

1.2.5　半透明带结合实验　在显微操作仪下将人卵细胞对切成两半，以微吸管吸净卵细胞浆，得到 2 个完全相同的半透明带。向载有配对半透明带的载玻片板（预涂多聚赖氨酸）上分别加入 1:50 稀释的兔抗 LYZL6 血清，用免疫前兔血清作为阴性对照，在 37 ℃培养箱（含 5% CO_2）孵育 2 h。向清洗后的半透明带分别滴加 100 μL 获能的精子悬液（浓度为 2×10^5 个/mL），并以矿物油覆盖，37 ºC 孵育 4 h。用 BWW 培养基冲洗半透明带以去除松散结合的精子，在倒置显微镜下观察与半透明带紧密结合的精子并计数。

1.2.6 重组蛋白表达纯化　将表达 rLYZL6 的重组毕赤酵母菌株克隆接种 BMGY 种子培养基，30 ℃摇床培养 36 h 后转接至含有 2.5 L BMGY 培养基中，发酵罐高密度培养至甘油耗尽，每隔 12h 添加 0.5%甲醇进行诱导表达，96h 后结束发酵。将发酵液 5000× *g* 离心 30 min，收集上清，与一定体积甲壳素亲和介质混合，室温搅拌、静置；将甲壳素介质装填层析柱，使用 PBS 灌洗柱床后，换用 0.01 mol/L 醋酸溶液洗脱，将洗脱液收集后装入透析袋中对 PBS 透析，使用 Amicon® Ultra 超滤管（截留分子量 3 kDa）浓缩；将浓缩液上 Sephadex G-75 析柱洗脱，监控 A_{280nm} 并收集独立洗脱峰，超滤浓缩后进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.7 肽聚糖和透明质酸结合能力测定　使用 40 μg/mL 的肽聚糖溶液或 100 μL 的 100 μg/mL 的透明质酸溶液包被 96 孔酶联板，37 ℃孵育过夜；加入 200 μL 的 1 mg/mL 牛血清白蛋白封闭 2 h；分别加入 100 μL 醋酸盐冲液（pH 5.0）配制的 0.25 μmol/L，0.5 μmol/L 和 1 μmol/L 的 rLYZL6 液，室温孵育 3 h；每孔加入 100 μL 兔抗 LYZL6 免疫血清，37 ℃孵育 1 h；每孔加入 100 μL 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG，37℃孵育 1 h。以上各步骤间均用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次。最后加入邻苯二胺显色液显色，酶标仪测 A_{450nm} 计算 ELISA 指数。ELISA 指数（ELISA Index）=测试样品的平均 A_{450nm}/空白对照的平均 A_{450nm}。以 HAase 和 LYZ 为对照，实验重复两次。

1.2.8 透明质酸水解活性测定　向 0.5 mL 的透明质酸溶液（0.15%，w/v）中分别加入 0.5 mL 的 1 μmol/L，5 μmol/L 和 10 μmol/L 的 rLYZL6 溶液，37℃反应 24 h，煮沸 10 min 停止反应，5000× *g* 离心 10 min 以沉淀变性蛋白；取上清液 0.5 mL，加入 1 mL DNS 溶液，煮沸 10 min 使其完全显色，冷却后立即测定 A_{540nm}，以 HAase 酶、LYZ 和 PBS 为对照，实验重复两次。

1.2.9 自由基清除活性测定　用甲醇配置 0.05%的 DPPH 溶液，向 2 mL DPPH 溶液中分别加入 1 μmol/L，5 μmol/L 和 10 μmol/L 的 rLYZL6 溶液 0.5 mL，室温下暗处静置 30 min，记录反应后 A_{519nm}，自由基清除率（%）=（A_0-$A_{30\ min}$）/A_0 × 100%，A_0 和 A_{30min} 分别为加入样品溶液时和 30 min 后测定的吸光值，以 LYZ 和 PBS 为对照，实验重复两次。

1.2.10 异肽酶活性测定　使用 0.05 mol/L 的 3-（N-吗啉基）丙磺酸缓冲液（MOPS，pH 7.0，含有 0.01 mol/L NaCl）配制 0.0175 mol/L 的 L-γ-Glu-pNA 底

物溶液。取 rLYZL6 溶液 100 μL 与 2.5 mL 底物溶液混合，室温反应 1 h，每 10 min 记录 A_{405nm} 上升值（ΔA_{405nm}），以 LYZ 和 PBS 为对照，绘制吸光度曲线。

1.2.11　统计学分析　所得数据用 SPSS 17.0 统计软件分析。组间比较采用配对样本 *t* 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　精子免疫荧光检测　对精子细胞进行计数后，在 95%以上的精子细胞检测到免疫荧光，荧光位于精子头部顶体后区域（图 1）。

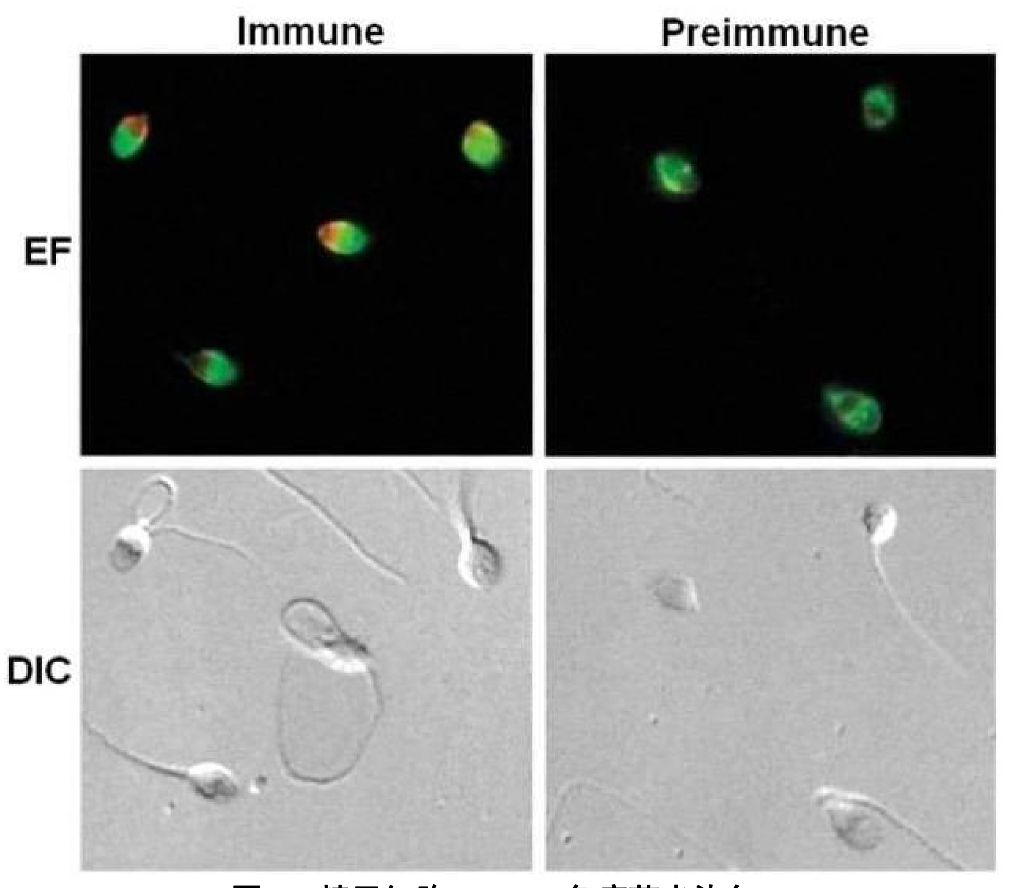


图 1　精子细胞 LYZL4 免疫荧光染色

Fig. 1　Immunofluorescence staining of LYZL4 in spermatozoa

2.2　RT-PCR 分析　为检测精子上 LYZL6 的来源，本研究使用 RT-PCR 分析 *LYZL6* 基因在男性生殖系统的表达情况。结果显示在睾丸和附睾中均检测到 *LYZL6* 基因表达，睾丸的表达水平高于附睾，未检测到在精子中的表达，表明精子表面的 LYZL6 蛋白来源于睾丸和附睾的分泌（图 2）。

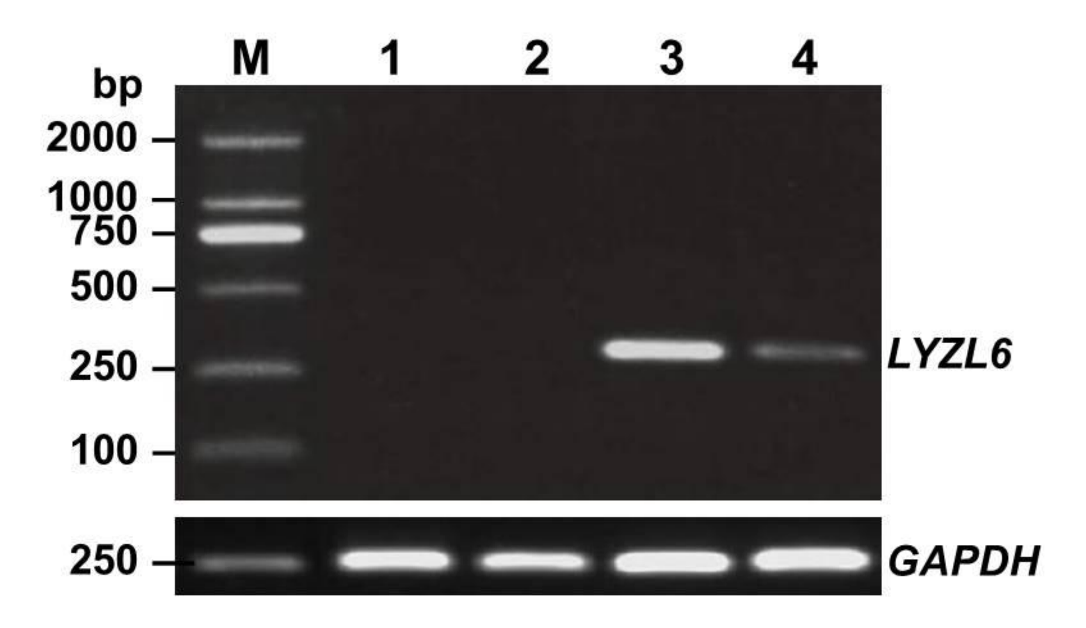
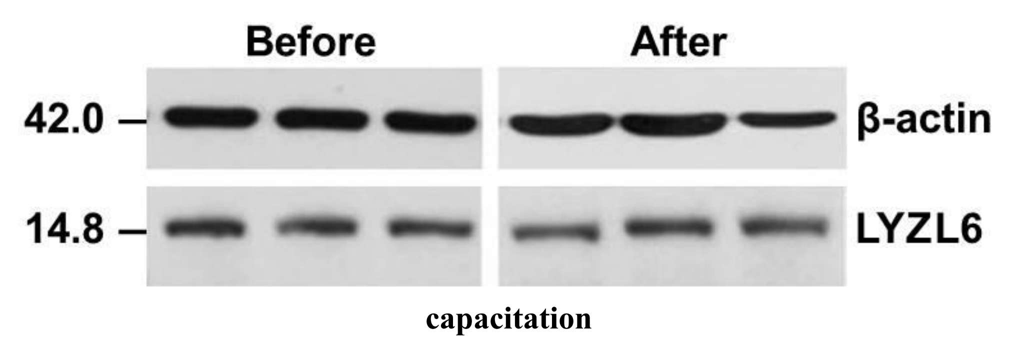


图 2　*LYZL6* 在男性生殖系统中的表达谱分析

Fig. 2　Expression profile of *LYZL6* in male reproductive system

M: DL2000 DNA marker; 1, testicular cDNA; 2: epididymal cDNA; 3: sperm cDNA

2.3　精子 LYZL6 免疫检测　本研究通过 Western blot 检测获能前后精子蛋白提取物中 LYZL6 的改变。结果表明获能后精子表面 LYZL6 的量无明显改变(图 3)。



capacitation

2.4　仓鼠卵精子穿透试验　使用 1:100，1:200 和 1:400 稀释度的兔抗 LYZL6 血清孵育获能精子后，与卵子融合的精子数明显下降，与对照组相比分别下降了 65.4%，61.9%和 51.5%，1:800 和 1:1600 稀释度的抗血清没有引起明显下降；因此，兔抗 LYZL6 血清对精卵融合有剂量依赖的抑制作用（图 4）。

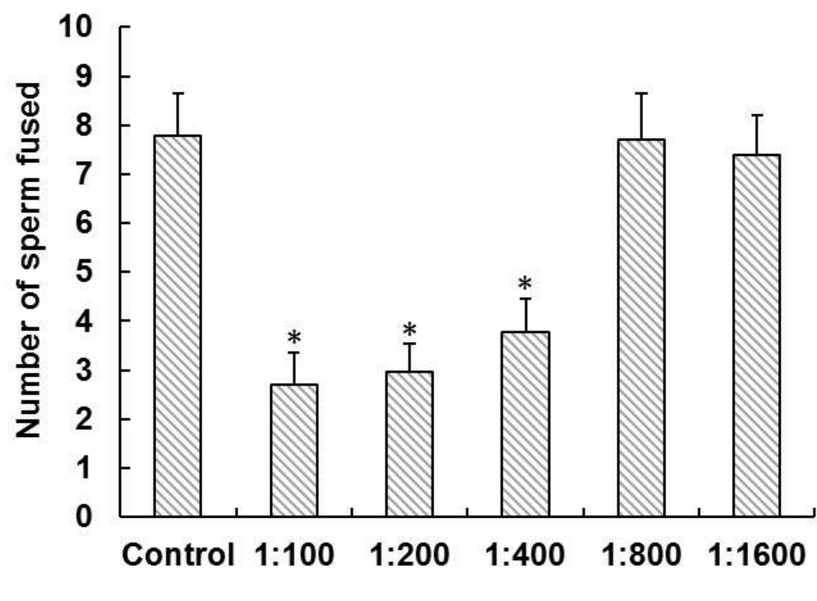


图 4　抗 LYZL6 血清对精卵融合的影响（n=3）

Fig. 4　Effect of LYZL6 antiserum on sperm-egg fusion (n=3)

* $P < 0.05$ vs the control group

2.5　半透明带结合试验　实验表明经 1:10，1:50 及 1:200 稀释度的抗 LYZL6 血清孵育精子后，平均有 62、46 和 56 个精子与半透明带结合，而以免疫前兔血清孵育的精子进行的配对半透明带试验，平均结合精子数分别为 54、52 和 49。统计学分析提示各种稀释度的抗 LYZL6 血清均不能显著地抑制精子与透明带结合（图 5）。

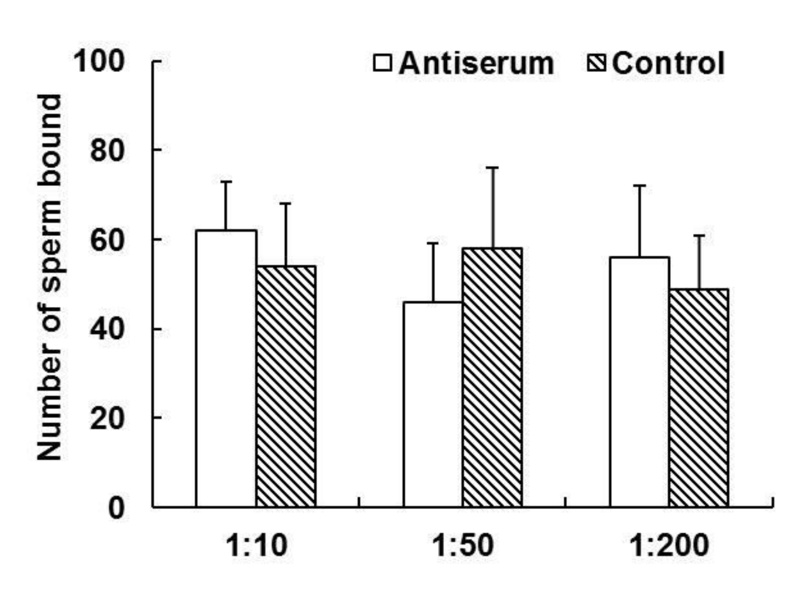


图 5　抗 LYZL6 血清对精子透明带结合的影响（n=8）

Fig. 5　Effect of LYZL6 antiserum on sperm-hemizona binding (n=8)

2.6　重组蛋白表达纯化　通过 SDS-PAGE 可在发酵液上清检测到～14.8 kDa 的目的蛋白表达，分子量与 LYZL6 预期大小一致（图 6）。采用甲壳素亲和层析和分子筛层析纯化后能够得到相同分子量蛋白，免疫印迹检测确认其为 rLYZL6（图 7）。

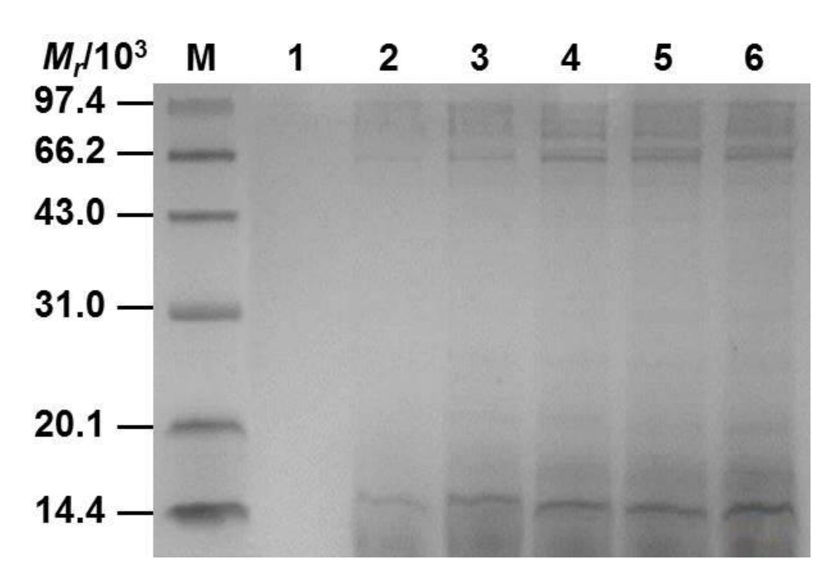


图 6　发酵液上清 SDS-PAGE 电泳

Fig. 6　SDS-PAGE of the fermentation supernatant

M: Molecular weight marker; 1: Supernatant before induction; 2-6: Supernatant after induction

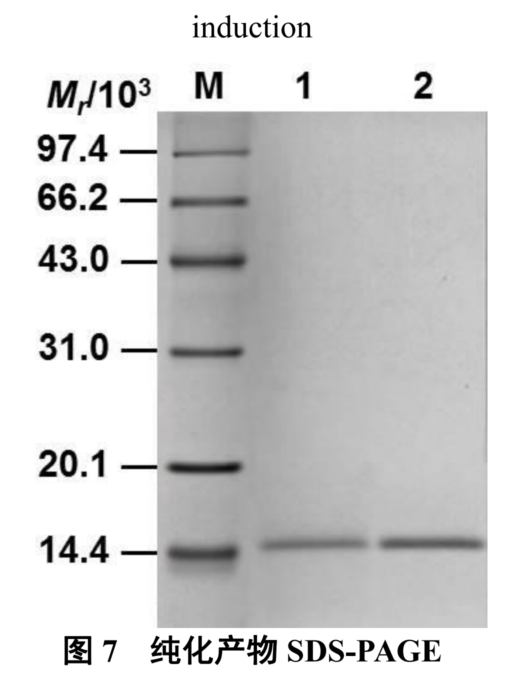


图 7　纯化产物 SDS-PAGE

Fig. 7　SDS-PAGE of purified product

M: Molecular weight marker; 1-2: purified rLYZL6

2.7 肽聚糖结合能力测定 测定结果表明，在 pH 5.0 条件下，rLYZL6 的肽聚糖结合能力明显高于 LYZ（图 8）。

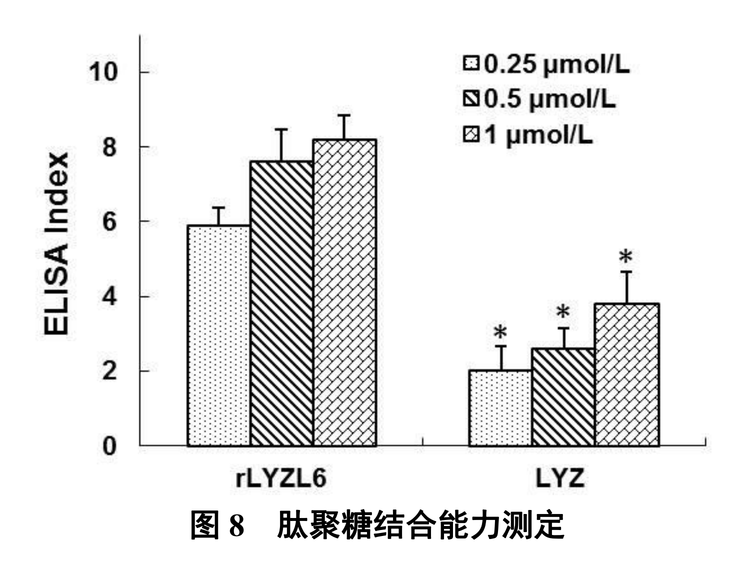


图 8 肽聚糖结合能力测定

Fig. 8 Assays of peptidoglycan binding ability

* $P < 0.05$ vs the LYZ group

2.8 透明质酸结合能力测定 测定结果表明，HAase 具有较强的透明质酸结合能力，LYZ 具有较弱的透明质酸的结合能力，rLYZL6 的透明质酸结合能力最弱，明显低于 HAase 和 LYZ（图 9）。

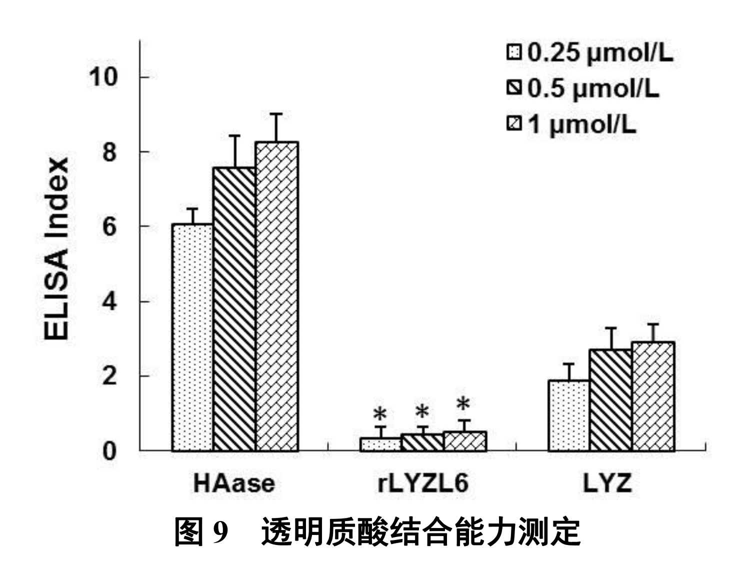


图 9 透明质酸结合能力测定

Fig. 9 Assays of hyaluronan binding ability

* $P < 0.05$ vs the HAase group and the LYZ group

2.9 透明质酸水解活性测定 结果表明，透明质酸酶显示了浓度依赖的透明质酸水解活性， rLYZL6 和 LYZ 均未检测到明显的透明质酸水解活性，两者无明

显差别（图 10）。

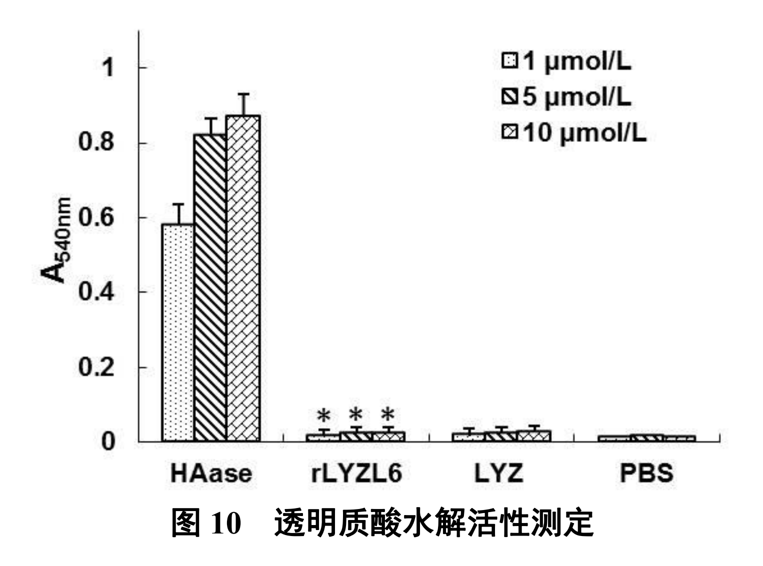


图 10　透明质酸水解活性测定

Fig. 10　Assays of hyaluronan hydrolyzing activity

* $P < 0.05$ vs the HAase group

2.10　自由基清除活性测定　结果表明，LYZ 显示了浓度依赖的自由基清除活性，但未观察到 rLYZL6 有明显的自由基清除活性（图 11）。

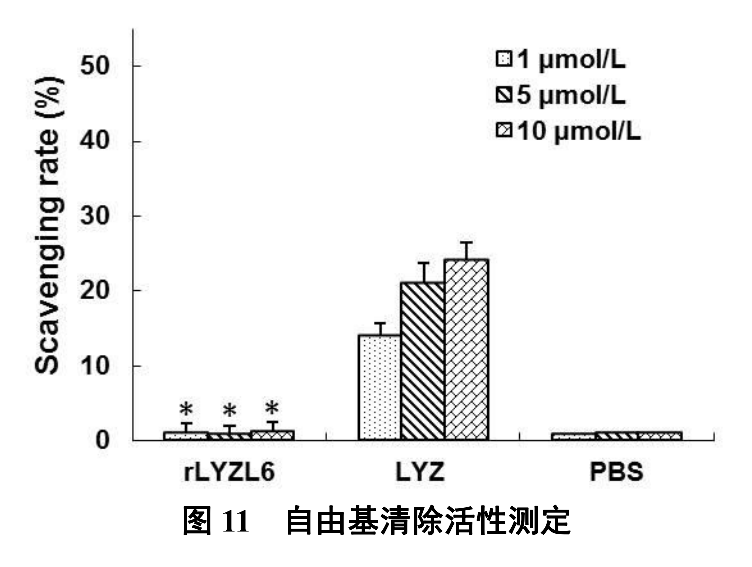


图 11　自由基清除活性测定

Fig. 11　Assays of free radical scavenging activity

*** $P < 0.05$ vs the LYZ group**

2.11　异肽酶活性测定　结果表明，LYZ 显示了较弱的异肽酶活性，rLYZL6 则显示了较强的浓度依赖的异肽酶活性，明显高于 LYZ（图 12）。

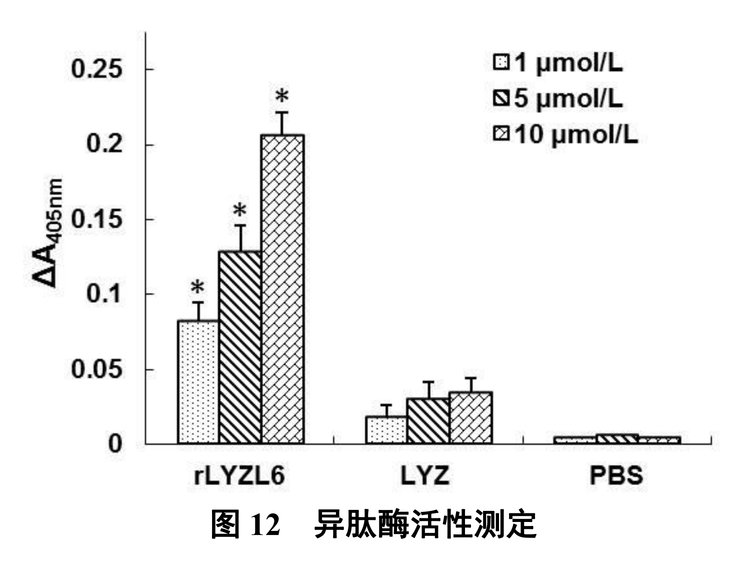


图 12　异肽酶活性测定

Fig. 12　Assays of isopeptidase activity

*** *P* < 0.05 vs the LYZ group**

3　讨论

本课题组此前采用免疫组化方法在睾丸中的晚期精母细胞及圆形精子细胞检测到 LYZL6 的定位，通过免疫荧光染色进一步确认了其定位于精子头部顶体后区域[10]。结合已有的研究可以发现，类溶菌酶蛋白被分泌后均定位于精子细胞上，但具体的亚细胞定位却不完全相同。如 SLLP1 被分泌后定位于精子头部的顶体细胞膜上，小鼠 LYZL4 定位于精子头部顶体和尾部，而 LYZL6 的定位与两者并不相同，这可能意味着各种类溶菌酶蛋白有不同的功能[3, 7]。虽然利用 Western blot 法在睾丸和附睾组织以及精子的蛋白提取物中可检测到了 LYZL6，但无法判定精子上的 LYZL6 的确切来源。本研究利用 RT-PCR 分析表明 LYZL6 并非由精子表达，而是由睾丸和附睾组织分泌后附着于精子头部顶体后区域。由于精子在进入女性生殖道后经历了获能过程，其表面分子会发生各种变化，一些早期附着在精子上的蛋白分子如糖蛋白 Glycodelin-S 发生丢失[12-13]。如果 LYZL6 存在这种情况，则有可能并不会在后续的受精过程中发挥作用。本研究通过检测获能前后精子蛋白提取物中的 LYZL6，确认了其在获能后并未发生丢失，因此 LYZL6 仍然有可能在受精过程中发挥作用。

对于成功的受精，精子需要依次经历一系列步骤，包括获能、穿过卵丘、结合透明带 ZP 蛋白、发生顶体反应、穿过透明带、与卵细胞膜结合等，在每个阶段都有各种分子发挥关键作用[14-15]。本研究使用了仓鼠卵精子穿透试验和半透明

带结合试验来初步调查 LYZL6 是否参与受精过程。使用抗 LYZL6 血清孵育精子后，明显降低了与卵细胞膜融合的精子数，这与此前的研究结果一致[10]；但使用抗 LYZL6 血清孵育精子后并不影响精子与透明带的结合，这意味着 LYZL6 对于受精过程而言可能仅在其中少数阶段（如精卵融合）中发挥作用。已有研究表明 SLLP1 可以在受精过程的精卵结合阶段发挥作用[7]，本课题组也发现 LYZL4 也显示了类似的功能（结果尚未发表），所以推测类溶菌酶家族蛋白能够在在受精过程的不同阶段发挥作用；此外，由于 SLLP1 能够通过与卵子细胞膜上的配体蛋白结合而在精卵结合中发挥作用，不排除 LYZL6 可以通过类似结合配体的方式在受精过程中发挥作用[16]。

有研究表明，睾丸和附睾中的一些蛋白会结合于精子上，在多种水平上影响精子功能，其中最重要的就是调节精子的生成和成熟[17-18]。除了这些功能，有些分子还具有抗菌作用，从而在男性生殖系统先天性免疫中发挥重要作用，如 HE2、EPPIN 和 PATE 家族蛋白[19-22]。LYZ 是男性生殖道分泌液中大量存在的分子之一，其除了可以发挥杀菌活性之外，还可以调解精液的粘度[23]。就目前研究所知，类溶菌酶蛋白的功能与 LYZ 并不相同。如 SLLP1 和 LYZL4 不具有明显的胞壁质酶活性，因此其不能水解细菌细胞壁中 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间 β-1，4-糖苷键，从而丧失了杀菌活性[7]。本课题组此前的研究表明 LYZL6 具有杀菌活性，且最适条件为酸性。本研究证明与 LYZ 相比，在低 pH 条件下 LYZL6 具有较强的肽聚糖结合能力，这正是保证其具有较强的杀菌活性的前提条件；此外，由于 LYZL6 发挥最大活性 pH 条件与女性阴道接近，因此有可能在精子进入女性生殖道后发挥一定的精子保护作用。

本研究还发现 LYZL6 具有较强的异肽酶活性。目前仅发现少数无脊椎动物型（invertebrate type，i 型）溶菌酶兼具异肽酶活性，如在花蛤和东部牡蛎中分离到的 i 型溶菌酶[24-25]。LYZL6 的异肽酶活性对于精子功能有何影响还尚待进一步研究，但已知的是，纤维蛋白的赖氨酸残基和谷氨酸残基的侧链间通过异肽键（isopeptide bond）相交联，异肽酶能够异肽键，使纤维蛋白得到溶解，具有溶解血栓的作用，这意味着 LYZL6 为血栓治疗提供了一种潜在的选择。值得注意的是，类溶菌酶家族蛋白似乎具有不同的生理特性，如 LYZL4 并不具有异肽酶活性（结果尚未发表）；此外，虽然 LYZL6 不能结合透明质酸和清除自由基，但

本课题组发现 LYZL4 具有较强的透明质酸结合能力和自由基清除能力，这提示不同的类溶菌酶蛋白在功能上有显著的差异性。

总的来看，本研究进一步证实 LYZL6 由睾丸和附睾分泌后定位于成熟精子头部的顶体后区域，可能在受精过程的精卵融合阶段发挥作用，除了具有杀菌活性之外还具有异肽酶活性，提示 LYZL6 可能通过多种机制参与精子功能。本课题组后续将对 LYZL6 在受精过程中的作用机制及其酶学活性的生理意义进行探讨，以期促进对类溶菌酶家族蛋白功能的理解。

参考文献

[1] Zhang K X, Gao R, Zhang H X, et al. Molecular cloning and characterization of three novel lysozyme-like genes, predominantly expressed in the male reproductive system of humans, belonging to the c-type lysozyme/alpha-lactalbumin family. Biology of Reproduction, 2005, 73(5): 1064–1071.

[2] Narmadha G, Muneswararao K, Rajesh A, et al. Characterization of a novel lysozyme-like 4 gene in the rat. PLoS One, 2011, 6: e27659.

[3] Sun R L, Shen R L, Li J, et al. Lyzl4, a novel mouse sperm-related protein, is involved in fertilization. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2011, 43(5): 346–353.

[4] Wei J, Li S J, Shi H, et al. Characterisation of Lyzls in mice and antibacterial properties of human LYZL6. Asian Journal of Andrology, 2013, 15(6): 824–830.

[5] Jolles P, Jolles J. What's new in lysozyme research? Molecular and Cellular Biochemistry, 1984, 63(2): 165–189.

[6] Prager E M, Jolles P. Animal lysozymes c and g: an overview. In: Jolles P (ed). Lysozymes: Model Enzyme in Biochemistry and Biology. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1996:9–31.

[7] Mandal A, Klotz K L, Shetty J, et al. SLLP1, a unique, intra-acrosomal, nonbacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa. Biology of Reproduction, 2003; 68(5): 1525–1537.

[8] 黄鹏, 李文姝, 谢君, 等. 人源类溶菌酶蛋白6在毕赤酵母中的重组表达及活性分析. 中国生物工程杂志, 2015, 35(8): 30–37.
Huang P, Li W S, Xie J, et al. Expression of human lysozyme-like protein 6 in *Pichia pastoris* and analysis of enzymatic activity of the protein. China Biotechnology, 2015, 35(8): 30–37.

[9] 黄鹏, 李文姝, 杨智昉, 等. 人源类溶菌酶蛋白6 在男性生殖系统中的表达. 中华男科学杂志, 2016, 22(7): 584–590.
Huang P, Li W S, Yang Z F, et al. Expression of human lysozyme-like protein 6 in the male reproductive system. National Journal of Andrology, 2016, 22(7): 584–590.

[10] Huang P, Li W S, Yang Z F, et al. LYZL6, an acidic, bacteriolytic, human sperm-related protein, plays a role in fertilization. PLoS One, 2017, 12(2): e0171452.

[11] 黄鹏, 杨智昉, 徐一新, 等. 人源类溶菌酶蛋白4的多克隆抗体制备及其表达分析. 中华男科学杂志, 2017, 23(1): 3–10.
Huang P, Yang Z F, Xu Y X, et al. Preparation of a polyclonal antibody against human LYZL4 and its expression in the testis. National Journal of Andrology, 2017, 23(1): 3–10.

[12] Chiu P C N, Tsang H Y, Chung M K, et al. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and capacitation of spermatozoa. Journal of Biology Chemistry, 2005, 280(27): 25580–25589.

[13] Visconti P E, Westbrook V A, Chertihin O, et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. Journal of Reproductive Immunology, 2002, 53(1-2): 133–150.

[14] Stein K K, Primakoff P, Myles D. Sperm–egg fusion: events at the plasma membrane. Journal of Cell Science, 2004, 117(26): 6269–6274.

[15] Rubinstein E, Ziyyat A, Wolf J-P, et al. The molecular players of sperm–egg fusion in mammals. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2006, 17(2): 254–263.

[16] Sachdeva M, Mandal A, Mulders S, et al. Oocyte specific oolemmal SAS1B

involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization. Developmental Biology, 2012, 361(1): 40–51.

[17] Dacheux J L, Dacheux F, Druart X. Epididymal protein markers and fertility. Animal Reproduction Science, 2016, 169: 76–87.

[18] Dacheux JL, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. Reproduction, 2014, 147(2): R27–42.

[19] Rajesh A, Yenugu S. Effect of immunization against prostate- and testis-expressed (PATE) proteins on sperm function and fecundity in the rat. Journal of Reproductive Immunology, 2015, 110: 117–129.

[20] Yenugu S, Hamil K G, French F S, et al. Antimicrobial actions of the human epididymis 2 (HE2) protein isoforms, HE2alpha, HE2beta1 and HE2beta2. Reproductive Biology and Endocrinology, 2004, 2: 61.

[21] Guo C, Diao H, Lian Y, et al. Recombinant expression and characterization of an epididymis-specific antimicrobial peptide BIN1b/SPAG11E. Journal of Biotechnology, 2009, 139(1): 33–37.

[22] Yenugu S, Richardson R T, Sivashanmugam P, et al. Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. Biology of Reproduction, 2004, 71(5): 1484–1490.

[23] Mendeluk G R, Blanco A M, Bregni C. Viscosity of human seminal fluid: role of lysozyme. Archives Andrology, 1997, 38(1): 7–11.

[24] Takeshita K, Hashimoto Y, Ueda T, et al. A small chimerically bifunctional monomeric protein: *Tapes japonica* lysozyme. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60(9): 1944–1951.

[25] Xue Q G, Itoh N, Schey K L, et al. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64(1): 82–95.